Aus der Medizinischen Universitätsklinik Würzburg
(Direktor: Prof. Dr. Kochsiek)

Isolierung und Charakterisierung des sarkoplasmatischen Retikulums aus Skelettmuskulatur urämischer Ratten

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

verfaßt und der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde

vorgelegt von

Klaus Ludwig Kröckel
aus Bad Neustadt an der Saale

Würzburg, den 30.9.1981

1982

Aus der Medizinischen Universitätsklinik Würzburg
(Direktor: Prof. Dr. Kochsiek)

Isolierung und Charakterisierung des sarkoplasmatischen Retikulums aus Skelettmuskulatur urämischer Ratten

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

verfaßt und der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde

vorgelegt von

Klaus Ludwig Kröckel
aus Bad Neustadt an der Saale

Würzburg, den 30.9.1981

Referent: Prof. Dr. A. Heidland

Korreferent: Prof. Dr. K. Kochsiek

Dekan: Prof. Dr. K. H. Wulf

Tag der mündlichen Prüfung: 17.2.1982

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Universität Würzburg

M E I N E R F R A U

U N D

M E I N E N E L T E R N

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543522_0053

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

1. Einleitung

1.1 Die molekularen Strukturen der Muskelzelle als Funktionseinheit 1

1.2 Einfluß der Urämie auf die Muskelzelle 3

2. Methoden

2.1 Operative Methode zur Erzeugung einer akut urämischen und chronischen urämischen Stoffwechsellage 6

2.1.1 Binephrektomie 6

2.1.2 90 % Nephrektomie 6

2.2 Präparative Methode zur Isolierung des sarkoplasmatischen Retikulums nach DE MEIS und HASSELBACH 7

2.3 Analytische Methoden 9

2.3.1 Harnstoff-N-Bestimmung 9

2.3.2 Proteinbestimmung nach LOWRY et al. 9

2.3.3 Glykogenbestimmung nach MONTGOMERY 10

2.3.4 Phosphatbestimmung nach FISKE und SUBAROW

Seite

2.3.5 Glykogensynthetasebestimmung nach THOMAS et al. 11

2.3.6 Ca^{2+} - ATPase Aktivitätsbestimmung nach DE MEIS und HASSELBACH, modifiziert nach HÖRL et al. 12

2.3.7 Phosphorylierung der Ca^{2+} - Transport-ATPase in Gegenwart von ATP - γ - ^{32}P 13

2.3.8 Aktivitätsbestimmung von Phosphorylase-Kinase automatisiert nach JENNISSEN und HEILMEYER 14

2.3.9 Aktivitätsbestimmung von Phosphorylase-Phosphatase nach HASCHKE et al. 14

2.3.10 Ca^{2+} Aufnahmerate in die Vesikel des sarkoplasmatischen Retikulums mit dem "Millipore" Multifiltrationsgerät 15

3. Ergebnisse

3.1 Präparation von sarkoplasmatischem Retikulum aus der Skelettmuskulatur von unbehandelten Kontrollratten 16

3.2 Präparation von sarkoplasmatischem Retikulum aus der Skelettmuskulatur von akut urämischen Ratten 18

3.3 Verhalten der Ca^{2+} - ATPase während der Vesikelpräparation aus der Skelettmuskulatur von Kontrolltieren 20

Seite

3.4 Verhalten der Ca^{2+} - ATPase während der Vesikelpräparation aus der Skelettmuskulatur von akut urämischen Tieren 22

3.5 Verhalten der Phosphorylase-Kinase während der Vesikelpräparation aus Skelettmuskulatur von akut urämischen und Kontrolltieren 24

3.6 Die spezifische Aktivität der Phosphorylase-Phosphatase während der Vesikelisolierung aus der Skelettmuskulatur von akut urämischen und Kontrollratten 26

3.7 Das Verhalten der Ca^{2+} - ATPase von Kontrolltieren bei verschiedenen Calciumkonzentrationen 28

3.8 Das Verhalten der Ca^{2+} - ATPase von akut urämischen Tieren bei verschiedenen Calciumkonzentrationen 30

3.9 Die spezifische Aktivität der Ca^{2+} - ATPase von unbehandelten Kontrollen bei verschiedenen Oxalatkonzentrationen 32

3.10 Die spezifische Aktivität der Ca^{2+} - ATPase von akut urämischen Tieren bei verschiedenen Oxalatkonzentrationen 34

3.11 Die spezifische Aktivität der Ca^{2+} - ATPase von Kontrollen bei verschiedenen Fluoridkonzentrationen 36

Seite

3.12 Die spezifische Aktivität der Ca^{2+} - ATPase von akut urämischen Tieren bei verschiedenen Fluoridkonzentrationen 38

3.13 Die spezifische Aktivität der Ca^{2+} - ATPase von Kontrollen bei verschiedenen ATP-Konzentrationen 40

3.14 Die spezifische Aktivität der Ca^{2+} - ATPase von akut urämischen Tieren bei verschiedenen ATP-Konzentrationen 42

3.15 Die spezifische Aktivität der Ca^{2+} - ATPase von Kontrollen in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration 44

3.16 Die spezifische Aktivität der Ca^{2+} - ATPase von akut urämischen Tieren bei verschiedenen Proteinkonzentrationen 46

3.17 Das Verhalten der Ca^{2+} - ATPase von Kontrolltieren bei verschiedenen Hydroxylaminkonzentrationen 48

3.18 Das Verhalten der Ca^{2+} - ATPase von akut urämischen Tieren bei verschiedenen Hydroxylaminkonzentrationen 50

3.19 Die spezifische Aktivität der Ca^{2+} - ATPase von Kontrollen und von akut urämischen Tieren in Abhängigkeit von der Zeit 52

3.20 Die Phosphorylierung von Vesikelprotein von Kontrolltieren und von akut urämischen Tieren 55

Seite

3.21 Speicherung $^{45}Ca^{2+}$ in den Vesikeln von Kontrollen und von akut urämischen Tieren 56

4. Diskussion 58

5. Zusammenfassung 63

6. Literaturverzeichnis 66

1. E I N L E I T U N G

1.1 Die molekularen Strukturen der Muskelzelle als Funktionseinheit

Die wesentliche Funktion der quergestreiften Muskulatur ist die antreibende Kraft des Bewegungs- und Halteapparates, zu dessen Bestandteil sie gezählt wird. Auf der zellulären Ebene übernehmen diese Funktion die kontraktilen Proteine. Die Interaktion von Aktin und Myosin wird von der freien sarkoplasmatischen Ca^{2+}-Konzentration reguliert (1,2), wobei gereinigtes Aktin und Myosin keine Calciumsensitivität besitzen. Dazu sind Tropomyosin und Troponin notwendig (3,4).
Im ruhenden Muskel blockiert Tropomyosin die Interaktion von Aktin und Myosin. Die Steuerung erfolgt letztlich über Troponin, das aus drei Untereinheiten besteht: TNC, die Calcium bindende Untereinheit (5,6,7), TNI, die Inhibitorkomponente (8,9) und TNT, das mit Tropomyosin reagiert. Nach dem Zwei-Seiten-Modell (10) bindet TNT an Tropomyosin; TNC bindet in Abwesenheit von Ca^{2+} ebenso an Tropomyosin und Aktin und hält so Tropomyosin in einer Hemmposition für die Ausbildung von Querbrücken zwischen Aktin und Myosin. Freigesetztes Ca^{2+} bindet an TNC und bewirkt dadurch eine Konformationsänderung. Tropomyosin kann sich aus der Hemmposition bewegen. Dies führt zur Bindung der S_1-Untereinheiten des Myosins unter ATP-Spaltung an Aktin und zur Kontraktion.

Die dazu benötigte Energie wird zwar zum beträchtlichen Teil durch ß-Oxydation bereitgestellt, jedoch besteht eine auffallende Synchronisation von Muskelkontraktion und Aktivierung der Glykogenolyse und Glykolyse (11). Die Glykogenpartikel, ein Protein-Glykogen-Komplex, enthalten die meisten Enzyme, die an der Regulation des Glykogenstoffwechsels beteiligt sind: Phosphorylase, Phosphorylase-Kinase, Phosphorylase-Phosphatase, Debranching-Enzym und eine Reihe glykolytischer Enzyme. Es läßt sich nachweisen, daß die Zugabe von Ca^{2+} zu diesen Glykogenpartikeln in Gegenwart von ATP und Mg^{2+} zu einer plötzlichen Aktivierung der Phosphorylase führt. Dieses Phänomen wird als Blitzaktivierung der Phosphorylase bezeichnet (12).

Die Regulation der intrazellulären Ca^{2+}-Konzentration erfolgt durch das sarkoplasmatische Retikulum, die Speicherorganelle der Muskelzelle für Calcium. Die freie Ca^{2+}-Ionenkonzentration liegt im ruhenden Muskel bei 10^{-8} M. Nervale Reizung depolarisiert die Muskelmembran. Über Einstülpungen des Sarkolemms, die transversalen Tubuli, die in vielfacher Verbindung mit dem longitudinalem System, dem sarkoplasmatischen Retikulum, stehen, setzt dieser Reiz Ca^{2+} frei. Der Anstieg der freien Ca^{2+}-Ionenkonzentration auf 10^{-6} M führt zur Muskelkontraktion (2,13,14).

Das sarkoplasmatische Retikulum wurde als Calcium-Transportsystem mit ATP als Energiequelle definiert (15).

Der Rücktransport des Ca^{2+} erfolgt durch die Calcium-Transport-ATPase, einem in der Membranfaktion des sarkoplasmatischen Retikulums gelegenen Enzyms. Es wird über zwei Zügel gesteuert: Die Aktivierung erfolgt durch Phosphorylierung, katalysiert durch eine Calcium-abhängige Proteinkinase, die Dephosphorylierung und Inaktivierung über eine Protein-Phosphatase.
Die Aktivität der Calcium-Transport-ATPase läßt sich durch Effektoren beeinflussen. Oxalat und Fluorid stimulieren die Ca^{2+}-Transport-ATPase-Aktivität maximal bei einer Konzentration, die zu einer 80 % Hemmung der Phosphatase-Aktivität führt. Hydroxylamin inhibiert die Aktivität der Ca^{2+}-Transport-ATPase indirekt durch Hemmung der Aktivität der Ca^{2+}-abhängigen Protein-Kinase (16,17).

1.2 Einfluß der Urämie auf die Muskelzelle

Der Proteinkatabolismus bei akuter und chronischer Niereninsuffizienz betrifft in erster Linie die quergestreifte Muskulatur. Parallel dazu treten erhebliche Störungen des Kohlenhydratstoffwechsels auf (18). So fällt z.B. bei binephrektomierten Ratten bereits nach 20 h die Aktivität der Glykogen-Synthetase auf 10 % der Norm ab (19). Histochemische Untersuchungen zeigten eine Verminderung der mittleren Muskelfaserquerschnittsfläche, die vor allem Typ II-Fasern, also die vorwiegend glykolytisch aktive Muskulatur, betrifft. Es zeigt sich, daß sich die Typ II-Fasern mehr und mehr den Typ I-Fasern angleichen (20).

Diese katabole Stoffwechselsituation könnte zum einen hormonell bedingt sein:

- Es liegt bei Urämie eine relative Insulinresistenz vor (21).
- Erhöhte Serumkonzentration von Catecholaminen führen am Muskel über einen intrazellulären Anstieg (22) von cAMP zu einer Aktivierung der cAMP-abhängigen Protein-Kinase. Über eine Aktivierung von Phosphorylase-Kinase und Phosphorylase wird schließlich Glykogen abgebaut (23).

Eine weitere Ursache für die Glykogenolyse der Skelettmuskulatur bei akuter Urämie könnte eine veränderte Struktur kontraktiler Proteine darstellen. Am Troponinkomplex ließ sich beispielsweise zeigen, daß die inhibitorische Komponente (TNI) bei akuter Urämie erheblich vermindert ist (23). Daraus könnte sich eine vermehrte Aktin-Myosin-Interaktion ergeben, die zu einem erhöhten ATP-Verbrauch mit konsekutivem Abbau von Glykogen führen würde (23). Schließlich könnte die Glykogenolyse bei Urämie über eine Calciumaktivierung von Phosphorylase-Kinase erfolgen. Die halbmaximale Aktivierung des Enzyms geschieht bei Ca^{2+}-Konzentrationen von $5x10^{-7}$ M (12,24,25).
Untersuchungen von Matthews et al. (27) haben einen erhöhten Calciumefflux aus den Vesikeln des sarkoplasmatischen Retikulums bei akuter Urämie belegt. Ferner waren sowohl die initiale Ca^{2+}-Aufnahmerate als auch die maximale Ca^{2+}-Aufnahme erniedrigt (24).

Da Calcium und seine Kompartimentierung eine zentrale Rolle in der Funktionseinheit Muskelzelle spielt, sollte in der vorliegenden Arbeit nach Veränderungen des sarkoplasmatischen Retikulums bei akut urämischer Stoffwechsellage gesucht werden.

2. METHODIK

2.1 Operative Methode zur Erzeugung einer akut urämischen und chronischen urämischen Stoffwechsellage

2.1.1 Binephrektomie

Als Versuchstiere dienten ca. 180 - 220 g schwere weibliche Wistar-Ratten (Fa. Ivanovas, Kisslegg/Allgäu). Die Tiere wurden mit Äther narkotisiert und auf dem Bauch gelagert. Das Fell wurde dorsal mit einem medianen Schnitt eröffnet und soweit wie nötig von den darunter liegenden Muskeln abpräpariert. Jetzt wurde mit je einem paravertebralen Schnitt durch die Muskulatur das Abdomen eröffnet. Die Niere wurde jeweils mit ihrem Gefäßstiel hervorgeholt und unter Schonung der Nebennieren dekapsuliert. Der Gefäßstiel wurde ligiert und beide Nieren abgetrennt. Nach Vernähen der beiden Muskelschnitte und des Hautschnittes wurden die Tiere in Einzelkäfige gebracht.

2.1.2 90 % Nephrektomie

Bis zur Darstellung beider Nieren wurde analog zu 2.1.1 vorgegangen.
Nach ligiertem Gefäßstiel und Dekapsulierung wurden die rechten Nieren entfernt, an der linken Niere wurde nach Dekapsulierung das craniale und caudale Drittel reseziert.

Die Wunden wurden mit einem Elektrokauter verschorft, um größeren Blutverlust zu vermeiden. Wegen einer reaktiven Hyperplasie der Restniere wurde der Nierenstumpf nach ca. 4 Wochen noch einmal nachreseziert.

2.2 Präparative Methode zur Isolierung des sarkoplasmatischen Retikulums nach DE MEIS und HASSELBACH (27)

Vesikel des sarkoplasmatischen Retikulums wurden von gesunden Normaltieren, 60 h nach beidseitiger Nephrektomie und von chronisch urämischen Ratten ca. 2 Wochen nach Nachresektion gewonnen.
Die Tiere wurden mit Äther betäubt und durch Eröffnen beider Karotiden entblutet. Dabei wurde Blut zur Serumharnstoff-N-Bestimmung gewonnen.
Etwa 100 - 150 g Muskelfleisch wurde von den Hinterläufen abpräpariert und in Eis auf 4 °C abgekühlt.
Alle folgenden Isolierungsschritte wurden bei einer Temperatur zwischen 0 °C und 4 °C durchgeführt.
Die gewonnene Muskelmasse wurde in einem Fleischwolf zerkleinert und mit der dreifachen Menge einer Lösung aus 100 mM KCl, 2 mM EDTA, 2.5 mM KH_2PO_4, 2.5 mM K_2HPO_4 und 10 mM Tris/HCl (4 °C) zusammengegeben. Diese Mischung wurde im Warring-Blendor für 2 Minuten homogenisiert. Zur Abtrennung von Myofibrillen und Mitochondrien wurde das Gemisch für 15 Minuten bei 10 000 rpm zentrifugiert (Sorvall-Kühlzentrifugen). Um Fettgewebe abzutrennen wurde der Überstand durch Glaswolle filtriert.

Jetzt wurde eine Aliquot (A 1) von 1 ml für die Erstellung einer Reinigungstabelle entnommen. Nach jedem weiteren Zentrifugationsschritt wurde ebenso verfahren. Den Überstand zentrifugierten wir für 105 Minuten bei 13 000 rpm. Der Niederschlag wurde in einer Lösung, die 1 M Sucrose und 50 mM KCl enthielt, aufgenommen und im Teflon-Hand-Potter homogenisiert (A 2).
Das homogenisierte Material wurde für 15 Minuten bei 6 500 rpm zentrifugiert. Zum Überstand wurden 30 ml KCl (2 M), 2 ml ATP (0.1 M, pH 7.0), 2 ml Mg Cl_2 (0,1 M) und 26 ml aqua dest. zugegeben (A 3). Anschließend wurde 90 Minuten mit 30 000 rpm zentrifugiert. (Beckman-Ultrazentrifuge). Vorher wurden die Zentrifugenbecher je mit 1 ml 2 M Sucrose unterschichtet. Der Niederschlag wurde in 50 ml 0.1 M KCl aufgenommen und im Teflon-Potter homogenisiert (A 4). Die Vesikelsuspension wurde für 60 Minuten bei 30 000 rpm zentrifugiert, nachdem wiederum mit 1 ml Sucrose unterschichtet wurde. Der Niederschlag wurde wiederum in 50 ml 0.1 M KCl aufgenommen und homogenisiert (A 5). Nun wurde mit 1 ml konzentriertem Glycerin unterschichtet und bei 30 000 rpm für 60 Minuten zentrifugiert. Der Niederschlag wurde in 5 ml 0.1 M KCl aufgenommen und erneut homogenisiert (A 6 = Vesikelfraktion).

2.3 Analytische Methoden

2.3.1 Harnstoff-N-Bestimmung

Die Bestimmung des Harnstoff-N- im Serum der Ratten erfolgte automatisiert (Technikon-Autoanalyzer) nach Routinemethoden.

2.3.2 Proteinbestimmung nach LOWRY et al (28)

Reagenz A: Zu 48 ml einer 2 % Na_2CO_3 in 0.1 N NaOH-Lösung wurde 1 ml einer 1 % Natrium-Kalium-Tartrat Lösung und dann 1 ml 0,5 % $CuSO_4$ x 5 H_2O Lösung gegeben.

Reagenz B: Folin-Reagenz wurde 1:2 mit aqua dest. verdünnt.

0.5 ml Probe wurden mit 5 ml Reagenz A vermischt und für 10 Minuten bei Zimmertemperatur inkubiert. Dann wurden 0.5 ml Reagenz B hinzugegeben. Wiederum erfolgte Inkubation für 10 Minuten. Die Extinktion der Proben wurde bei einer Wellenlänge von 750 nm gemessen.

Leerwert: 0,5 ml aqua dest.
5 ml Reagenz A
0,5 ml Reagenz B

Die Berechnung der Proteinkonzentration in den Proben erfolgte mittels einer Eichkurve von 100 - 500 µg/ml Rinderserumalbumin.

2.3.3 Glykogenbestimmung nach MONTGOMERY (29)

Zu 0.5 ml Probe wurde 0.5 ml 10 % TCA (Trichloressigsäure) gegeben und bei 4 °C für 10 Minuten inkubiert, um das Protein der Probe auszufällen. Das Präzipitat wurde für 10 Minuten bei 3 000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 95 % Äthanol von 4 °C bis zu einer Endkonzentration von 66 % versetzt. Nach erneuter 10 minütiger Inkubation bei 4 °C wurde für 10 Minuten bei 4 °C mit 3 000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abpipettiert und der Niederschlag in 2 ml aqua dest. gelöst. Nach Zugabe von 0.2 ml 40 % Phenol und 5 ml konzentrierter Schwefelsäure (innerhalb 5 Sekunden) wurde der Ansatz zur Farbentwicklung 30 Minuten bei Zimmertemperatur stehengelassen. Bei einer Wellenlänge von 490 nm wurde die Extinktion der Proben gemessen.
Als Leerwert dienten 2 ml H_2O + 0.2 ml 40 % Phenol + 5 ml konzentrierte Schwefelsäure.
Die Berechnung der Glykogenkonzentration der einzelnen Proben erfolgte anhand einer Glykogeneichkurve von 10 - 100 µg/ml.

2.3.4 Phosphatbestimmung nach FISKE und SUBBAROW (30)

0.2 ml Probe wurden zu 4.5 ml Stop-Reagenz (300 ml 2.5 % Ammoniummolybdat, 2.7 ml 10 % SDS und 42 ml konz. H_2SO_4 wurden mit aqua dest. auf 2 700 ml aufgefüllt) gegeben, dann wurden 0.25 ml ANSA (in einem Endvolumen von 4 000 ml wurden 148.7 g $NaHSO_3$,

5.0 g Na_2SO_3 und 2.5 g 1-Amino-2-Hydroxy-Naphtalin-Sulfonsäure-(4) gelöst) hinzupipettiert.
Zur Farbentwicklung blieb der Ansatz 30 Minuten bei Zimmertemperatur stehen. Dann wurde die Extinktion bei einer Wellenlänge von 660 nm bestimmt.
Als Leerwert dienten 0.2 ml H_2O + 4.5 ml Stop-Lösung + 0.25 ml ANSA.
Als Standard diente eine 1.6 mM Phosphatlösung.

2.3.5 Glykogensynthetaseaktivitätsbestimmung nach THOMAS et al. (31)

Reagenzien:

A: 3.75 mM ^{3}H-UDP-Glucose als Substrat
(21.2 mg UDP-Glucose auf 10 ml aqua dest.
+ 0.1 ml ^{3}H-UDP-Glucose).

B: Stammlösung zur Bestimmung der Synthetase (D+I-Form)
4 ml 10 % Glykogen
4 ml 0.625 M Tris/HCl, 0.0125 M EDTA, 0.156 M $MgCl_2$, pH 7.6
2 ml 0.0625 M Glucose-6-Phosphat

C: Stammlösung zur Bestimmung der Synthetase (I-Form)
4 ml 10 % Glykogen
4 ml 0.625 M Tris/HCl, 0.0125 M EDTA, 0.156 M $MgCl_2$, pH 7.6

Ansatz:

100 µl Lösung A wurden mit 50 µl Probe und 20 µl Lösung B bzw. C bei 30 °C inkubiert. Nach 5, 10 und 15 Minuten wurde je ein aliquot von 50 µl auf ein Whatman Filterplättchen gegeben. Die Plättchen wurden für 20 Minuten in 66 % Äthanol von 4 °C getaucht. Dann wurde der Alkohol gewechselt.
Nach weiteren 10 Minuten wurden die Plättchen in Aceton bei Zimmertemperatur inkubiert. Die Plättchen wurden getrocknet, in Szintillationsgläschen gegeben und mit je 5 ml Rotiszint 11 versetzt.
Die Aktivität der einzelnen Proben wurde in einem Packard-Liquid-Szintillation-Counter bestimmt.
Als Leerwert diente der Ansatz mit aqua dest. als Probe.
Als Totalwert wurden 50 µl Lösung A auf einem Filterplättchen genommen (cpm total).

2.3.6 Ca^{2+}- ATPase Aktivitätsbestimmung nach DE MEIS und HASSELBACH (27), modifiziert nach HÖRL et al. (16)

Zu 1.8 ml ATPase Mix (5 mM $MgCl_2$, 100 mM KCl, 50 mM Imidazol/HCl, pH 7.0, 1.5 mM EGTA) wurden 0.1 ml Vesikel gegeben. Die Protein-Endkonzentration lag um 0.1 mg/ml. Durch Zusatz von 0.1 ml 0.1 M ATP (pH 7.0) wurde die Reaktion gestartet. Nach 2 und 4 Minuten wurden Proben zu je 0.2 ml entnommen und in 0.2 ml 20 % SDS (Natriumdodecylsulfat) abgestoppt.

In der 5. Minute erfolgte die Zugabe von 10 µl 0.22 M $CaCl_2$ (Endkonzentration 1.38 mM/ml). Nach 5'30", 6' und 6'30" wurden wiederum je 0.2 ml Proben entnommen und in 0.2 ml 20 % SDS abgestoppt. In der 7. Minute wurde 20 µl 0.2 M Oxalat (Endkonzentration 4 mM/ml) zugegeben.
Zum Zeitpunkt 7'30", 8', 9' und 10' wurden wiederum Proben zu je 0.2 ml entnommen und wie beschrieben in SDS abgestoppt. Anschließend erfolgte die Phosphatbestimmung nach der unter 2.3.4 angegebenen Methode.

2.3.7 Phosphorylierung der Ca^{2}-Transport - ATPase in Gegenwart von ATP - γ - ^{32}P nach Makinose (32)

Wie bei der Ca^{2+} - ATPase Aktivitätsbestimmung wird zu 1.8 ml ATPase Mix (5 mM Mg Cl_2, 100 mM KCl, 50 mM Imidazol/HCl, pH 7.0, 1.5 mM EGTA) Vesikelprotein (Endkonzentration 1 mg/ml) hinzugegeben. Die Reaktion wird mit ^{32}P markiertem ATP (2 Mill. cpm/100 µl ATP 0.1 M) gestartet. Die Entnahmezeiten wie unter 2.3.6. Die entnommenen Proben werden in 1 ml 10 % TCA abgestoppt und 10 Minuten bei 0 ^{o}C gekühlt. Anschließend wird die Probe 10 Minuten mit 3 000 rpm mit der Tischzentrifuge zentrifugiert. Der Niederschlag wird in konz. Ameisensäure aufgelöst und die Proben in Szintillationscounter gezählt.

2.3.8 Aktivitätsbestimmung von Phosphorylase-Kinase automatisiert nach JENNISSEN und HEILMEYER (33)

Die spezifische Aktivität der Phosphorylase-Kinase wurde automatisiert mit Phosphorylase b als Substrat bei pH 6.8 und 8.6 gemessen (Technikon Autoanalyzer). Lyophilisierte Phosphorylase b wurde uns freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. Heilmeyer, Institut für Physiologische Chemie der Ruhr-Universität Bochum zur Verfügung gestellt.

2.3.9 Aktivitätsbestimmung von Phosphorylase-Phosphatase nach HASCHKE et al. (34)

Zur Bestimmung werden 0.1 ml Probe (in der Regel 3 Verdünnungen in 50 mM Tris/HCl, 20 mM ME (Mercaptoäthanol), pH 7.5) mit 0.1 ml ^{32}P-markierter Phosphorylase a (2.5 mg/ml, gelöst in 50 mM Tris/HCl, 20 mM ME, pH 7.5) im Wasserbad bei 30 ^{o}C für 20 Minuten inkubiert. Nach Zugabe von 0.1 ml Rinderserumalbumin (25 mg/ml) wird die Reaktion mit 0.7 ml 10 % Trichloressigsäure (TCA) gestoppt. Nach 10 Minuten Inkubation bei 0 ^{o}C wurde der Niederschlag bei 3 000 x g abzentrifugiert, vom Überstand wurden je 0.5 ml zur Bestimmung des freigesetzten Phosphats in 5 ml Szintillationslösung B gegeben.
Nach Bestimmung von Leerwert und Totalwert wurde die Aktivitätseinheit der Phosphorylase-Phophatase bestimmt, als diejenige Menge Enzym die pro Minute 1 nM ^{32}P-Phosphat unter angegebenen Testbestimmungen freisetzte.

^{32}P-markierte Phospharylase a wurde uns freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. Heilmeyer, Ruhr-Universität Bochum zur Verfügung gestellt.

2.3.10 Messung der Ca^{2+} - Aufnahmerate in die Vesikel des sarkoplasmatischen Retikulum mit dem "Millipore" Multifiltrationsgerät

Nach Anlegen eines Vakuums wurden aus dem Inkubationsansatz von

1.0 ml Vesikel
14.4 ml ATPase Mix
0.8 ml ATP (0.1 M)
0.1 ml $^{45}Ca^{2+}$ (0.13 M)
0.35 ml Oxalat (0.2 M)

in folgenden Zeitabständen je 0.5 ml auf die Filterplättchen (0.2 µ Porengröße) des Multi-Filtrationsgerätes gegeben (Zeitpunkt: 0, 15, 30, 45, 60, 1.10, 1.20, ... und weiter alle 10 Sekunden bis zu 3 Minuten). Der Start der Calciumspeicherung durch die Vesikel erfolgt durch die Zugabe von ATP.
Die Plättchen wurden in Szintillationslösung gegeben und die Radioaktivität wurde schließlich in einem Packard Liquid Szintillation Counter gemessen. Als Leerwert dienten Proben vor Start der Reaktion.

3. E R G E B N I S S E

3.1 Präparation von sarkoplasmatischem Retikulum aus der Skelettmuskulatur von unbehandelten Kontrollratten

Nach der Methode von DE MEIS und HASSELBACH (29) wurde sarkoplasmatisches Retikulum aus der Skelettmuskulatur von sieben unbehandelten Kontrollratten (Körpergewicht 180 - 220 g) isoliert. Der mittlere Harnstoff-N betrug 17.3 mg/dl.

Tabelle 1 zeigt das Verhalten von Protein, Glykogen Glykogensynthetase (aktive I-Form) und Ca^{2+} - ATPase während der Vesikelisolierung. Im Rohextrakt von 370 ml wurden 4 960 mg Protein (Konzentration 13.4 mg/ml) parallel dazu 62 µg Glykogen (12.5 µg Glykogen pro mg Protein) gefunden. Im Verlauf der Isolierung ging die Ausbeute an Protein auf 2 % des Ausgangswertes zurück, die des Glykogens sank auf unter 1 % (Summe Glykogen: 50 µg). Entgegengesetzt verhält sich die spez. Aktivität der Ca-ATPase. Sie stieg um das 10-fache von 0.057 auf 0.51 µMol x min^{-1} x mg^{-1}, bei einer Gesamtausbeute von 20 %.

Die spezifische Aktivität der Glykogen-Synthetase (I-Form) betrug im Rohextrakt 130 nMol x min^{-1} x mg^{-1}. Im Verlauf der Reinigung ging die Aktivität auf 7 nMol x min^{-1} x mg^{-1} zurück. Zu Beginn der Vesikelisolierung lag die Glykogen-Synthetase zu 83 % in der I-Form vor, nach dem letzten Schritt nur noch in 26 %.

Fraktion	Vol.	Protein			Glykogen			Glyk.-synthet.I	I in % von D+I	Ca^{2+} - ATPase	
	ml	mg	mg/ml	%	µg	µg/mg Protein	%	nM x min^{-1} x mg $Prot.^{-1}$	%	µM x min^{-1} x mg $Prot.^{-1}$	%
Rohextrakt	370	4.960	13.4	100	62.000	12.5	100	130	83	0.057	100
44 000 x g Sediment	41	322	7.8	7	57.000	177	92	550	83	0.34	39
ATP-2 M KCl Extrakt	102	270	2.6	6	42.000	157	68	124	35	0.37	36
0.1M kCl Extrakt	52	153	2.9	3	4.150	27	7	85	36	0.49	27
0.1M KCl Extrakt	51	183	3.6	2.8	1.800	9.8	2	28	35	0.52	26
Vesikel	6	110	18.3	2	50	0.5	1	7	26	0.51	20

Tabelle 1: Verhalten von Protein, Glykogen, Glykogen - Synthetase (aktive I-Form) und Ca^{2+} - ATPase während der Vesikelisolierung aus Skelettmuskulatur unbehandelter Kontrollratten.

3.2 Präparation von sarkoplasmatischem Retikulum aus der Skelettmuskulatur von akut urämischen Ratten

Zur Gewinnung von sarkoplasmatischem Retikulum aus akut urämischen Tieren wurden 7 Tiere (Körpergewicht 180 - 220 g) nach der unter 2.1.1 (1) beschriebenen Methode binephrektioniert und nach 60 h getötet. Der mittlere Harnstoff-N betrug 257.3 mg/dl.

Tabelle 2 zeigt das Verhalten von Protein, Glykogen, Glykogen-Synthetase und Ca-ATPase während der Vesikelpräparation.
Im 270 ml Rohextrakt fanden sich 4 240 mg Protein (Konzentration 15.7 mg/ml) und 5.6 mg Glykogen (1.32 µg pro mg Protein). In der Vesikelfraktion ging das Protein auf eine Gesamtmenge von 55 mg (Konzentration 11.0 mg/ml, entsprechend 1.3 % der Ausgangsmenge) zurück. Das Glykogen fiel auf unter 1 % (10 µg) der Ausgangsmenge (0.8 µg Glykogen/mg Protein).
Die spezifische Aktivität der Ca-ATPase stieg von 0.19 auf 0.79 µMol x min^{-1} x mg^{-1} (5-fach), bei einer Gesamtausbeute von 5.3 %.
Der Anteil der aktiven Glykogensynthetase aus der gesamten Aktivität blieb während der Präparation annähernd gleich und betrug um 90 %, die spezifische Aktivität fiel von 66 auf 8 nMol x min^{-1} x mg^{-1}.

Fraktion	Vol.	Protein			Glykogen			Glyk.-synthet.I	I in % von D+I	Ca^{2+} - ATPase	
	ml	mg	mg/ml	%	µg	µg/mg Protein	%	nM x min^{-1} x mg $Prot.^{-1}$	%	µM x min^{-1} x mg $Prot.^{-1}$	%
Rohextrakt	270	4.240	15.7	100	5.600	1.3	100	66	80	0.19	100
44 000 x g Sediment	40	175	4.4	4	4.800	27.4	85	80	98	0.55	12
ATP-2 M KCl Extrakt	95	124	2.0	3	4.300	36.6	77	53	90	0.72	11
0.1M KCl Extrakt	61	96	1.6	2.3	1.900	19.8	34	51	86	0.70	8
0.1M KCl Extrakt	54	75	1.4	1.8	600	8.0	11	80	88	0.80	7.5
Vesikel	5	55	11.0	1.3	10	0.8	1	8	85	0.79	5.3

Tabelle 2: Verhalten von Protein, Glykogen, Glykogen-Synthetase (aktive I-Form) und Ca^{2+} - ATPase während der Vesikelisolierung aus Skelettmuskulatur akut urämischer Ratten.

3.3 Tabelle 3 zeigt das Verhalten der Ca^{2+} - ATPase während der schrittweisen Vesikelpräparation aus Skelettmuskulatur von Kontrolltieren.
Die Bestimmungen wurden bei einer ATP - Konzentration von 5 mMol/ml, einer Calcium-Konzentration von 1.38 mMol/ml und einer Oxalat-Konzentration von 4 mMol/ml durchgeführt.
Die basale spezifische Aktivität im Rohextrakt stieg von 0.03 auf 0.19 µMol x min^{-1} x mg^{-1} in der Vesikelfraktion um das 6-fache. Von der durch Calcium stimulierten Aktivität wurde die basale Aktivität subtrahiert. Sie betrug im Rohextrakt 0.03 und in der Vesikelfraktion mit 0.32 uMol x min^{-1} x mg^{-1} das 10-fache.
Die basale Aktivität wurde ebenfalls von der durch Oxalat stimulierten Aktivität subtrahiert. Hier zeigt sich eine Aktivitätssteigerung von 0.04 im Rohextrakt auf 0.78 µMol x min^{-1} x mg^{-1} in der Vesikelfraktion um das 20-fache.
Im Rohextrakt betrug das Verhältnis der Aktivitäten 1:1:1, in der Vesikelfraktion 1:2:4. Dies schlug sich auch im Quotienten aus Oxalat-stimulierter Aktivität zu Calcium-stimulierter Aktivität nieder, der im Rohextrakt 1.3 und in der Vesikelpräparation 2.5 betrug.

	Rohextrakt	44 000 x g Sediment	ATP-2M KCl Extrakt	0.1M KCl - Extrakt	0.1M KCl - Extrakt	Vesikel
spez. Aktivität basal	0.03	0.19	0.2	0.22	0.24	0.19
$U_{ges.}$	145	61	55	34	34	21
spez. Aktivität Ca^{2+} stim. - basal	0.03	0.15	0.17	0.27	0.28	0.32
$U_{ges.}$	139	49	45	41	39	35
spez. Aktivität Ox^{2-} stim. - basal	0.04	0.32	0.34	0.61	0.65	0.78
$U_{ges.}$	205	104	93	93	90	86
$\frac{Ox^{2-}\text{ stim. - basal}}{Ca^{2+}\text{ stim. - basal}}$	1.3	2.1	2.1	2.3	2.3	2.5

Tabelle 3: Das Verhalten der basalen, der Calcium stimulierten und der durch Oxalat stimulierten Ca^{2+} - ATPase während der Vesikelisolierung aus der Skelettmuskulatur von Kontrollratten.

3.4 Tabelle 4 zeigt die spez. Aktivität der Ca^{2+}-ATPase während der Vesikelpräparation aus der Skelettmuskulatur von akut urämischen Tieren. Die ATP-, Calcium- und Oxalatkonzentrationen waren die gleichen wie unter 3.3 angegeben. Von der durch Calcium und Oxalat stimulierten Aktivität wurde jeweils die basale Aktivität abgezogen.

Die basale ATPase-Aktivität betrug im Rohextrakt 0.05 und in der Vesikelfraktion 0.38 µMol x min^{-1} x mg^{-1} (8-fache Steigerung). Die durch Calcium stimulierte Aktivität stieg von 0.14 auf 0.42 µMol x min^{-1} x mg^{-1} etwa um das 3-fache. Ebenfalls um das 3-fache stieg die von Oxalat stimulierbare Aktivität von 0.31 im Rohextrakt auf 0.9 µMol x min^{-1} x mg^{-1} in der Vesikelfraktion.
Das Verhältnis der ATPase-Aktivitäten im Rohextrakt betrug 1:3:6, in der Vesikelfraktion 1:1:2. Dementsprechend verhielt sich auch der Quotient aus Oxalat-stimulierter Aktivität zu Calcium-stimulierter Aktivität, der sowohl im Rohextrakt als auch in der Vesikelpräparation 2.2 betrug.

	Rohextrakt	44 00 x g Sediment	ATP-2M KCl Extrakt	0.1M KCl Extrakt	0.1M KCl-Extrakt	Vesikel
spez. Aktivität basal	0.05	0.23	0.36	0.35	0.4	0.38
$U_{ges.}$	212	40	45	34	30	21
spez. Aktivität Ca^{2+} stim. - basal	0.14	0.32	0.36	0.35	0.4	0.41
$U_{ges.}$	590	56	45	34	30	23
spez. Aktivität Ox^{2-} stim. - basal	0.31	0.61	0.68	0.72	0.83	0.90
$U_{ges.}$	1 300	107	84	70	62	50
$\frac{Ox^{2-}\text{ stim. - basal}}{Ca^{2+}\text{ stim. - basal}}$	2.2	1.9	1.9	2.1	2.1	2.2

Tabelle 4: Das Verhalten der basalen, der durch Calcium und der durch Oxalat stimulierten Ca^{2+} - ATPase Aktivität während der Vesikelisolierung aus der Skelettmuskulatur von akut urämischen Ratten.

3.5 Tabelle 5 zeigt die spezifische Aktivität der Phosphorylase-Kinase von Kontrollratten und von akut urämischen Ratten während der Vesikelpraparation. Die Aktivität wird bei einem sauren (pH 6.8) und einem alkalischen (pH 8.6) Milieu bestimmt. Weiterhin wird der Quotient der beiden Aktivitäten gebildet.

Es zeigt sich, daß in beiden Präparationen die Aktivität vom Rohextrakt bis zu den Vesikeln auf cirka 1 % sinkt. Die spezifische Aktivität der Phosphorylase-Kinase ist bei den akut urämischen Tieren gegenüber der Aktivität der Kontrollen in allen Präparationsschritten erniedrigt, sie beträgt im Rohextrakt bei pH 6.8 78 %, bei pH 8.6 90 %. Im Verlauf der Präparation nimmt der Unterschied weiter zu und beträgt bei der Vesikelfraktion bei pH 6.8 nur noch 36 %, bei pH 8.6 44 %.
Der Quotient der Aktivitäten bewegt sich in beiden Präparationen im selben Bereich und zwar bei den Kontrolltieren um 0.35, bei den akut urämischen Tieren um 0.30.

	Spezifische Aktivität Phosphorylase-Kinase					
	Kontrollratten			akut urämische Ratten		
	pH 6.8	pH 8.6	$\frac{\text{pH 6.8}}{\text{pH 8.6}}$	pH 6.8	pH 8.6	$\frac{\text{pH 6.8}}{\text{pH 8.6}}$
Rohextrakt	72.4	184.2	0.39	56.5	166.2	0.34
44 000 x g Sediment	24.3	70.6	0.34	18.5	61.7	0.30
ATP - 2 M KCl Extrakt	20.9	64.2	0.32	18.3	70.4	0.26
0.1 M KCl Extrakt	1.2	3.0	0.39	0.67	1.43	0.47
0.1 M KCl Extrakt	0.9	2.6	0.34	0.4	1.3	0.31
Vesikel	0.6	1.9	0.30	0.22	0.83	0.27

Tabelle 5: Das Verhalten der spezifischen Aktivität der Phosphorylase-Kinase (in nM x min^{-1} x mg $Protein^{-1}$)während der Vesikelpräparation aus Skelettmuskulatur von Kontrollratten und akut urämischen Tieren.

3.6 Tabelle 6 zeigt die spezifische Aktivität der Phosphorylase-Phosphatase in den einzelnen Präparationsschritten der Vesikelisolierung aus Skelettmuskulatur von Kontrolltieren und von akut urämischen Ratten. Bei den Kontrolltieren beträgt die spezifische Aktivität im Rohextrakt 23.6 nMol x min^{-1} x mg $Protein^{-1}$, bei den akut urämischen Tieren 28.2 nMol x min^{-1} x mg $Protein^{-1}$. Nach dem ersten Reinigungsschritt steigt die spezifische Aktivität bei den Kontrolltieren um das 1.5-fache auf 37.3, bei den akut urämischen um fast das 3-fache auf 79.3 nMol x min^{-1} x mg $Protein^{-1}$. In den weiteren Präparationsschritten sinkt die spezifische Aktivität ab und erreicht nach dem letzten Reinigungsschritt in der Vesikelpräparation bei den Kontrolltieren 4.9 nMol x min^{-1} x mg $Protein^{-1}$, entspricht 20 % des Ausgangswertes, bei den akut urämischen 3.2 nMol x min^{-1} x mg $Protein^{-1}$, entspricht 11 %. Die Gesamtaktivität liegt bei beiden Präparationen unter 1 %. (In der Tabelle nicht aufgeführt).

	spezifische Aktivität Phosphorylase-Phosphatase	
	Kontrollratten	akut urämische Ratten
Rohextrakt	23.6	28.8
44 000 x g Sediment	37.3	79.3
ATP - 2 M KCl Extrakt	34.4	46.0
0.1 M KCl Extrakt	6.2	16.8
0.1 M KCl Extrakt	8.6	24.3
Vesikel	4.9	3.2

Tabelle 6: Die spezifische Aktivität der Phosphorylase-Phosphatase in nMol x min^{-1} x mg $Protein^{-1}$ während der Vesikelisolierung aus der Skelettmuskulatur von unbehandelten Kontrolltieren und akut urämischen Tieren.

3.7 Tabelle 7 zeigt die spezifische Aktivität der Ca^{2+} - ATPase bei verschiedenen Calcium-Konzentrationen, isoliert aus Skelettmuskulatur von Kontrolltieren.

Bei einer Calcium-Konzentration von 0.63 mMol/ml betrug die spez. Aktivität der ATPase 0.18, bei einer Calcium-Konzentration von 0.13 mMol/ml wurde ein Plateau mit einer ATPase-Aktivität von 0.29 uMol x min^{-1} x mg^{-1} erreicht. Bei der Calcium-Konzentration von 1.44 mMol/ml sank die spez. Aktivität auf 0.23 µMol x min^{-1} x mg^{-1}.

Die durch Oxalat stimulierte ATPase-Aktivität betrug bei einer Calcium-Konzentration von 0.63 mMol/ml 0.18 und stieg schließlich bis auf 0.82 uMol x min^{-1} x mg^{-1} bei einer Calcium-Konzentration von 1.40 mMol/ml. Bei 1.44 mMol/ml Calcium fiel die spez. Aktivität um 25 % auf 0.6 µMol x min^{-1} x mg^{-1}.

Ca^{2+} (mM/ml)	spezifische Aktivität basal	Ca^{2+}stim.	Ox^{2-}stim.	$\frac{Ox^{2-}stim.}{Ca^{2+}stim.}$
0.63	0.18	0.18	0.18	1.0
0.94	0.18	0.23	0.53	2.1
0.13	0.18	0.29	0.53	1.8
1.25	0.18	0.29	0.7	2.4
1.4	0.18	0.29	0.82	2.8
1.44	0.18	0.23	0.6	2.8

Tabelle 7: Das Verhalten der spezifischen Aktivität der Ca^{2+} - ATPase (in µMol x mg^{-1} x min^{-1}) von Normaltieren in Abhängigkeit von der Calcium-Konzentration (Endkonzentration im Ansatz zwischen 0.63 und 1.44 mMol/ml).

3.8 Tabelle 8 zeigt die spezifische Aktivität der Ca^{2+} - ATPase von akut urämischen Tieren bei verschiedenen Calcium-Konzentrationen, ansonsten herrschten Standardbedingungen (Protein 0.1 mg/ml, ATP 5 mMol/ml und Oxalat 4 mMol/ml).
Bei einer Calcium-Konzentration von 0.63 mMol/ml betrug die spez. Aktivität der ATPase 0.3, ab einer Calcium-Konzentration von 0.94 mMol/ml war die ATPase-Aktivität gleichbleibend 0.41 µMol x min^{-1} x mg^{-1}.
Die Oxalat stimulierte Aktivität blieb unter den Bedingungen einer akuten Urämie von der Calcium-Konzentration praktisch unabhängig und betrug zwischen 0.8 und 0.9 µMol x min^{-1} x mg^{-1}.

Ca^{2+} (mM/ml)	spezifische Aktivität basal	Ca^{2+}-stim.	Ox^{2}-stim.	$\frac{Ox^{2}\text{-stim.}}{Ca^{2+}\text{stim.}}$
0.63	0.38	0.3	0.82	2.7
0.94	0.38	0.41	0.82	2.0
1.13	0.4	0.41	0.82	2.0
1.25	0.38	0.41	0.9	2.2
1.4	0.4	0.41	0.9	2.2
1.44	0.38	0.41	0.9	2.2

Tabelle 8: Das Verhalten der spezifischen Aktivität der Ca^{2+} - ATPase (in µMol x mg^{-1} x min^{-1}) von akut urämischen Tieren in Abhängigkeit von der Calcium-Konzentration (Endkonzentration im Ansatz zwischen 0.63 und 1.44 mMol/ml).

3.9 Tabelle 9 zeigt die spez. Aktivität der Ca^{2+}-ATPase von unbehandelten Kontrolltieren bei verschiedenen Oxalat-Konzentrationen, alle übrigen Parameter lagen in Standardkonzentrationen vor.

Die basale und die Calcium-stimulierbare ATPase-Aktivität blieben unverändert.
Die durch Oxalat stimulierte ATPase-Aktivität betrug bei einer Konzentration von 1 mMol/ml 0.4 und bei der Standardkonzentration von 4 mMol/ml mit 0.7 µMol x min^{-1} x mg^{-1} fast das doppelte. Die weitere Steigerung der spezifischen ATPase-Aktivität mit Erhöhung der Oxalatkonzentration war deutlich geringer und betrug z.B. bei 20 mMol/ml Oxalat 0.94 µMol x min^{-1} x mg^{-1}.

Ox^{2-} (mM/ml)	spezifische Aktivität basal	Ca^{2+}stim.	Ox^{2-}stim.	$\frac{Ox^{2-}stim.}{Ca^{2+}stim.}$
1	0.18	0.29	0.4	1.4
4	0.18	0.32	0.7	2.2
8	0.21	0.29	0.82	2.8
15	0.18	0.29	0.82	2.8
20	0.18	0.29	0.94	3.2

Tabelle 9: Die spezifische Aktivität der Ca^{2+} - ATPase (in µMol x mg^{-1} x min^{-1}) von Kontrolltieren in Abhängigkeit von der Oxalatkonzentration (Endkonzentration im Ansatz zwischen 1 und 20 mMol/ml).

3.10 Tabelle 10 zeigt die spezifische Aktivität der Ca^{2+}-ATPase akut urämischer Tiere bei verschiedenen Oxalatkonzentrationen, alle übrigen Parameter lagen im Ansatz in Standardkonzentrationen vor.

Die basale ATPase-Aktivität blieb mit 0.38 und die Calcium-stimulierte Aktivität mit 0.41 µMol x min^{-1} x mg^{-1} unverändert.

Bei einer Oxalat-Konzentration von 1 mMol/ml betrug die spezifische Aktivität 0.36 und war mit 0.82 µMol x min^{-1} x mg^{-1} bei 4 mMol/ml Oxalat auf etwas mehr als das Doppelte angestiegen. Der weitere ATPase-Aktivitätsanstieg betrug bei 8 mMol/ml Oxalat 0.08 µMol x min^{-1} x mg^{-1} und blieb dann auch bei weiterer Erhöhung der Oxalatkonzentration unbeeinflußt.

Ox^{2-} (mM/ml)	spezifische Aktivität basal	Ca^{2+} stim.	Ox^{2-} stim.	$\frac{Ox^{2-}\text{ stim.}}{Ca^{2+}\text{ stim.}}$
1	0.38	0.41	0.36	0.9
4	0.38	0.41	0.82	2.0
8	0.38	0.41	0.9	2.2
15	0.38	0.41	0.9	2.2
20	0.38	0.41	0.9	2.2

Tabelle 10: Die spezifische Aktivität der Ca^{2+} - ATPase (in µMol x mg^{-1} x min^{-1}) von akut urämischen Tieren in Abhängigkeit von der Oxalat-Konzentration (Endkonzentration im Ansatz zwischen 1 und 20 mMol/ml).

3.11 Tabelle 11 zeigt die spezifische Aktivität der Ca^{2+} - ATPase von Kontrolltieren. Im Versuchsansatz wurde Oxalat durch Fluorid ersetzt und die Fluoridkonzentration variiert.

Die basale und die von Calcium-stimulierbare Aktivität blieb von dem Fluoridzusatz unberührt.

Bei einer Fluoridkonzentration von 1 mMol/ml entsprach die spez. Aktivität von 0.29 uMol x min^{-1} x mg^{-1} der durch bloße Calcium-Zugabe gemessenen Enzym-Aktivität.

Bei einer Fluoridkonzentration von 10 mMol/ml erreichte die spez. Aktivität ein Maximum von 0.76 µMol x min^{-1} x mg^{-1}. Bei einer Fluorid-Konzentration von 50 mMol/ml war mit einer spezifischen ATPase-Aktivität von 0.35 µMol x min^{-1} x mg^{-1} bereits wieder eine Abnahme der ATPase-Aktivität zu verzeichnen.

Fluorid (mM/ml)	spezifische Aktivität basal	Ca^{2+} stim.	F^- stim.	$\frac{F^- \text{ stim.}}{Ca^{2+} \text{ stim.}}$
1	0.18	0.29	0.29	1.0
5	0.18	0.29	0.58	2.0
10	0.18	0.29	0.76	2.6
20	0.18	0.29	0.58	1.8
50	0.18	0.29	0.35	1.2

Tabelle 11: Das Verhalten der spezifischen Aktivität der Ca^{2+} - ATPase (in µMol x mg^{-1} x min^{-1}) von Kontrolltieren in Abhängigkeit von der Fluoridkonzentration, die anstatt Oxalat im Ansatz variiert wurde (zwischen 1 und 50 mMol/ml).

3.12 Tabelle 12 zeigt die Fluoridwirkung an Vesikel akut urämischer Tiere.
Bei einer Fluorid-Konzentration von 1 mMol/ml zeigte sich auch hier keine Aktivitätssteigerung gegenüber der von Calcium allein stimulierten ATPase-Aktivität. Bei einer Fluorid-Konzentration von 10 mMol/ml trat eine deutliche Aktivitätssteigerung ein: 0.82 µMol x min^{-1} x mg^{-1}, die sich mit zunehmender Fluorid-Konzentration kaum veränderte. Auch bei 50 mMol/ml Fluorid blieb die Aktivität mit 0.76 µMol x min^{-1} x mg^{-1} praktisch unverändert hoch.

Fluorid (mM/ml)	spezifische Aktivität basal	Ca^{2+} stim.	F^- stim.	$\frac{F^- \text{ stim.}}{Ca^{2+} \text{ stim.}}$
1	0.38	0.41	0.41	1.0
5	0.38	0.41	0.76	1.9
10	0.43	0.41	0.82	2.0
20	0.38	0.46	0.82	1.8
50	0.38	0.41	0.76	1.9

Tabelle 12: Das Verhalten der spezifischen Aktivität der Ca^{2+} - ATPase (in µMol x mg^{-1} x min^{-1}) von akut urämischen Tieren in Abhängigkeit von der Fluoridkonzentration, die anstatt Oxalat im Ansatz variiert wurde (zwischen 1 und 50 mMol/ml).

3.13 Tabelle 13 zeigt die Aktivität der Ca^{2+} - ATPase von Kontrolltieren bei verschiedenen ATP-Konzentrationen.

Bei einer ATP-Konzentration von 0.125 mMol/ml betrug die basale ATPase-Aktivität 0.06 und die Calcium-stimulierte Aktivität 0.03 µMol x min^{-1} x mg^{-1}. Während der Oxalataktivierung (ab der 7. Minute) fand keine weitere ATP-Spaltung mehr statt, offensichtlich war das zugesetzte ATP bereits verbraucht. Erst bei einer ATP-Konzentration von 0.5 mMol/ml steigerte sich die basale Aktivität auf 0.12 (2-fach), die Calcium-stimulierte Aktivität auf 0.17 (6-fach) und die Oxalat-stimulierte Aktivität auf 0.24 µMol x min^{-1} x mg^{-1}.

Basal wurde ein Maximum der Aktivierung mit 0.18 mMol x min^{-1} x mg^{-1} bei 1 mMol/ml ATP erreicht. Die Calcium-abhängige Stimulierung ließ ab 2.5 mMol/ml ATP nicht mehr weiter steigen. Auch bei der Oxalat-abhängigen Stimulierung der Ca^{2+} - ATPase war mit Erhöhung der ATP-Konzentration von 2.5 mMol/ml auf 5 mMol/ml nur noch eine geringfügige Steigerung um 0.06 µMol x min^{-1} x mg^{-1} zu verzeichnen.

ATP (mM/ml)	spezifische Aktivität basal	Ca^{2+} stim.	Ox^{2-} stim.	$\frac{Ox^{2-}\text{ stim.}}{Ca^{2+}\text{ stim.}}$
0.125	0.06	0.03	-	-
0.25	0.06	0.03	-	-
0.5	0.12	0.17	0.24	1.4
1.0	0.18	0.23	0.47	2.0
2.5	0.18	0.29	0.76	2.6
5.0	0.18	0.29	0.82	2.8

Tabelle 13: Das Verhalten der spezifischen Aktivität der Ca^{2+} - ATPase (in µMol x mg^{-1} x min^{-1}) von Kontrolltieren bei verschiedenen ATP-Konzentrationen (Endkonzentration im Ansatz zwischen 0.125 und 5.0 mMol/ml).

3.14 Tabelle 14 zeigt das Verhalten der Aktivität der Ca^{2+} - ATPase von akut urämischen Tieren bei verschiedenen ATP-Konzentrationen im Ansatz.

Bei einer ATP-Konzentration von 0.125 mMol/ml ATP betrug die basale Aktivität 0.04 µMol x min^{-1} x mg^{-1}. Ab der 5,5ten Minute ließ sich eine weitere ATP-Spaltung nicht mehr nachweisen (ATP verbraucht).

Bei einer ATP-Konzentration von 0.25 mMol/ml stieg die basale Aktivität um das 5-fache auf 0.20 µMol x min^{-1} x mg^{-1}. Die Calcium-stimulierbare ATPase-Aktivität betrug 0.07 µMol x min^{-1} x mg^{-1} bei 0.5 mMol/ml ATP, die Oxalat-stimulierbare ATPase lag bei 0.27 µMol x min^{-1} x mg^{-1} mit 1 mMol ATP im Ansatz.
Die basale ATPase-Aktivität nahm ab einer ATP-Konzentration von 0.5 mMol/ml nur noch gering zu.
Das Maximum der Aktivitätssteigerung war bei der Calcium- und bei der Oxalat-abhängigen Aktivierung des Enzyms mit einer ATP-Konzentration von 2.5 mMol/ml erreicht.

ATP (mM/ml)	spezifische Aktivität basal	Ca^{2+}stim.	Ox^{2-}stim.	$\frac{Ox^{2-}stim.}{Ca^{2+}stim.}$
0.125	0.04	-	-	-
0.25	0.2	-	-	-
0.5	0.27	0.07	-	-
1.0	0.3	0.14	0.27	2.0
2.5	0.34	0.3	0.82	2.7
5.0	0.38	0.41	0.9	2.2

Tabelle 14: Das Verhalten der spezifischen Aktivität der Ca^{2+} - ATPase (in µMol x mg^{-1} x min^{-1}) von akut urämischen Tieren bei verschiedenen ATP-Konzentrationen (Endkonzentration im Ansatz zwischen 0.125 und 5.0 mMol/ml).

3.15 Tabelle 15 zeigt das Verhalten der spez. Aktivität der Ca^{2+}-ATPase von Normaltieren in Abhängigkeit von der Protein-Konzentration. Alle übrigen Parameter waren in Standard-Konzentrationen im Ansatz.

Bei einer Protein-Konzentration von 0.1 mg/ml fand sich eine basale ATPase-Aktivität von 0.18 µMol x min^{-1} x mg^{-1}, die Aktivität bei einer Protein-Konzentration 0.2 mg/ml betrug mit 0.21 µMol x min^{-1} x mg^{-1} nur unwesentlich mehr.
Ähnlich verhielt es sich mit der durch Calcium-stimulierbaren Aktivität; sie betrug bei einer Protein-Konzentration von 0.1 mg/ml 0.29 µMol x min^{-1} x mg^{-1} und bei 0.2 mg/ml Protein 0.32 µMol x min^{-1} x mg^{-1}. Bei der durch Oxalat stimulierbaren ATPase-Aktivität betrug die spezifische Enzym-Aktivität für beide Protein-Konzentrationen 0.86 µMol x min^{-1} x mg^{-1}. Bei der Protein-Konzentration von 1.0 mg/ml lag die basale ATPase-Aktivität mit 0.09 µMol x min^{-1} x mg^{-1} um die Hälfte, die Calcium-stimulierte ATPase-Aktivität mit 0.11 µMol x min^{-1} x mg^{-1} um fast zwei Drittel und die durch Oxalat stimulierte ATPase-Aktivität mit 0.17 µMol x min^{-1} x mg^{-1} um 80 % unter der maximalen Aktivität.

spezifische Aktivität

Protein (mg/ml)	basal	Ca^{2+}stim.	Ox^{2-}stim.	$\frac{Ox^{2-}stim.}{Ca^{2+}stim.}$
0.05	0.09	0.23	0.82	3.7
0.1	0.18	0.29	0.86	3.0
0.2	0.21	0.32	0.86	2.7
0.5	0.14	0.25	0.5	2.0
1.0	0.09	0.11	0.17	1.5

Tabelle 15: Das Verhalten der spezifischen Aktivität der Ca^{2+} - ATPase (in µMol x mg^{-1} x min^{-1}) von Kontrolltieren bei verschiedenen Protein-Konzentrationen (Endkonzentration im Ansatz zwischen 0.05 und 1.0 mg/ml).

3.16 Tabelle 16 zeigt das Verhalten der Ca^{2+} - ATPase von akut urämischen Tieren bei verschiedenen Protein-Konzentrationen.

Ähnlich wie bei Normaltieren lag die höchste spezifische ATPase-Aktivität zwischen einer Protein-Konzentration von 0.1 mg/ml und 0.2 mg/ml.
Die basale und die durch Calcium-stimulierte ATPase-Aktivität waren bereits bei einer Protein-Konzentration von 0.05 mg/ml annähernd so hoch wie bei einer Protein-Konzentration von 0.1 mg/ml. Die Oxalat-stimulierbare ATPase-Aktivität war dagegen mit 0.49 µMol x min^{-1} x mg^{-1} bei dieser Protein-Konzentration nur halb so hoch.
Bei einer Protein-Konzentration von 1.0 mg/ml betrugen die basale, die Calcium- und die Oxalat-abhängige ATPase-Aktivität 20 % der maximalen Enzym-Aktivität.

Protein (mg/ml)	spezifische Aktivität basal	Ca^{2+}stim.	Ox^{2-}stim.	$\frac{Ox^{2-}stim.}{Ca^{2+}stim.}$
0.05	0.38	0.38	0.49	1.3
0.1	0.38	0.41	0.9	2.2
0.2	0.41	0.41	0.9	2.2
0.5	0.32	0.32	0.47	1.5
1.0	0.07	0.08	0.16	2.0

Tabelle 16: Das Verhalten der spezifischen Aktivität der Ca^{2+} ATPase (in µMol x mg^{-1} x min^{-1}) von akut urämischen Tieren bei verschiedenen Protein-Konzentrationen (Endkonzentration im Ansatz zwischen 0.05 und 1.0 mg/ml).

3.17 Tabelle 17 zeigt das Verhalten der Ca^{2+}-ATPase von Kontrolltieren in Abhängigkeit von der Hydroxylamin-Konzentration. Alle übrigen Parameter unter Standardbedingungen.

Die basale Aktivität blieb von der Hydroxylamin-Konzentration unbeeinflußt.
Die Calcium-stimulierte ATPase-Aktivität blieb bis zu einer NH_2OH-Konzentration von 20 mMol/ml unverändert, ab 50 mMol/ml NH_2OH zeigte sich eine Aktivitätssteigerung, die bei 200 mMol/ml NH_2OH schließlich etwas mehr als das Doppelte der normalen ATPase-Aktivität betrug.
Die Oxalat-stimulierte ATPase-Aktivität blieb von NH_2OH nahezu unbeeinflußt.
Da jedoch die Calcium-beeinflußte ATPase-Aktivität zunahm, erniedrigte sich der Oxalat-Calcium-Quotient von 2.8 bei 10 mMol/ml NH_2OH auf 1.3 bei 200 mMol/ml NH_2OH.

NH_2OH (mM/mL)	spezifische Aktivität basal	Ca^{2+} stim.	Ox^{2-} stim.	$\frac{Ox^{2-}\text{ stim.}}{Ca^{2+}\text{ stim.}}$
10	0.21	0.29	0.82	2.8
20	0.21	0.29	0.88	3.3
50	0.21	0.41	0.82	2.0
100	0.18	0.52	0.82	1.6
200	0.18	0.67	0.79	1.3

Tabelle 17: Das Verhalten der spezifischen Aktivität der Ca^{2+} - ATPase (in µMol x mg^{-1} x min^{-1}) von Kontrolltieren in Gegenwart von verschiedenen Hydroxylaminkonzentrationen (Endkonzentration im Ansatz zwischen 10 und 200 mM/ml).

3.18 Tabelle 18 zeigt das Verhalten der Ca^{2+}-ATPase von akut urämischen Tieren in Abhängigkeit von der Hydroxylaminkonzentration. Protein, ATP, Calcium und Oxalat waren in Standardkonzentrationen im Ansatz.

Die basale Aktivität zeigte nur methodische Schwankungen und blieb von der NH_2OH-Konzentration wiederum unbeeinflußt.
Die Calcium-stimulierte Aktivität blieb bei 50 mMol/ml NH_2OH nahezu unverändert und ging dann bis auf 30 % der ursprünglichen Aktivität bei 200 mMol/ml NH_2OH zurück.
Ähnlich verhielt es sich mit der Oxalat-stimulierten Aktivität, die bei einer NH_2OH-Konzentration von 10 mMol/ml mit 0.61 µMol x min^{-1} x mg^{-1} um 33 % unter der normalen Aktivität von 0.9 µMol x min^{-1} x mg^{-1} lag.
Bei 200 mMol/ml NH_2OH im Ansatz zeigte sich keine durch Oxalat stimulierbare ATPase-Aktivität mehr.

NH_2OH (mM/ml)	spezifische Aktivität basal	Ca^{2+}stim.	Ox^{2-}stim.	$\frac{Ox^{2-}stim.}{Ca^{2+}stim.}$
10	0.38	0.41	0.61	2.0
20	0.38	0.47	0.74	1.8
50	0.33	0.41	0.81	1.9
100	0.38	0.20	0.34	1.7
200	0.43	0.14	0.14	1.0

Tabelle 18: Das Verhalten der spezifischen Aktivität der Ca^{2+} - ATPase (in µMol x mg^{-1} x min^{-1}) von akut urämischen Tieren in Gegenwart von verschiedenen Hydroxylaminkonzentrationen (Endkonzentration im Ansatz zwischen 10 und 200 mMol/ml).

3.19 Tabelle 19 zeigt die basale, die durch Calcium und die durch Oxalat stimulierte Aktivität der Ca^{2+}-ATPase in Abhängigkeit von der Zeit.

Die Vesikel wurden bei einer Temperatur von 0 °C aufbewahrt und die Aktivität in 1-2 tägigem Abstand bestimmt.

Die basale Aktivität nahm bei den Kontrollvesikeln ab dem sechsten Tag um 25 % von 0.2 auf 0.15 µMol x min^{-1} x mg^{-1}, bei den akut urämischen Vesikeln um 20 % von 0.38 auf 0.3 µMol x min^{-1} x mg^{-1} ab.

Am 21. Tag war die basale Aktivität bei den Kontrollvesikeln um 60 % auf 0,08 µMol x min^{-1} x mg^{-1}, bei den akut urämischen Vesikeln um 47 % auf 0.020 µMol x min^{-1} x mg^{-1} gefallen, am 24. Tag war bei den Kontrollvesikeln keine Aktivität mehr zu messen, während sie bei den akut urämischen Vesikeln 0.18 µMol x min^{-1} x mg^{-1} betrug und erst am 30. Tag nicht mehr zu bestimmen war.

Im Gegensatz dazu stieg die durch Calcium stimulierte Aktivität in beiden Präparationen zunächst an und betrug bei den Kontrollvesikeln am 20. Tag 0.59 µMol x min^{-1} x mg^{-1}, bei den akut urämischen Vesikeln 0.82 µMol x min^{-1} x mg^{-1}. In beiden Präparationen betrug die Steigerung nahezu 100 %.

Wie bei der basalen war die durch Calcium stimulierte Aktivität am 24. Tag bei den Kontrollvesikeln auf nicht meßbare Aktivität zurückgegangen, während sie bei den akut urämischen Vesikeln erst am 30. Tag nicht mehr bestimmbar war.

Die durch Oxalat stimulierte Aktivität blieb bis zum 18. Tag in beiden Präparationen nahezu unverändert, sank bei den Kontrollvesikeln am 21. Tag um 63 % von 0.8 auf 0.32 µMol x min^{-1} x mg^{-1} und war am 24. Tag nicht mehr zu messen. Bei den akut urämischen Vesikeln war die Aktivität am 24. Tag noch unverändert, am 30. Tag, wie die basale und die Calcium-abhängige Aktivität nicht mehr zu bestimmen.

Zeit in Tagen	1.	3.	6.	10.	14.	16.	19.	21.	24.	30.
				Kontrolltiere						
spez. Aktivität basal	0.2	0.18	0.15	0.18	0.13	0.13	0.13	0.08	-	-
spez. Aktivität Ca^{2+}stim.-basal	0.32	0.37	0.42	0.58	0.53	0.53	0.59	0.43	0.05	-
spez. Aktivität Ox^{2-}stim.-basal	0.78	0.81	0.87	0.83	0.87	0.87	0.81	0.32	-	-
Quotient Ox^{2-}/Ca^{2+}	2.7	2.2	2.1	1.4	1.6	1.6	1.4	0.8	-	-
				akut urämische Tiere						
spez. Aktivität basal	0.38	0.38	0.3	0.22	0.22	0.18	0.22		0.18	-
spez. Aktivität Ca^{2+}stim.-basal	0.41	0.41	0.52	0.6	0.74	0.82	0.78		0.81	-
spez. Aktivität Ox^{2-}stim.-basal	0.9	0.9	0.99	0.94	0.94	0.89	1.03		1.05	-
Quotient Ox^{2-}/Ca^{2+}	2.2	2.2	1.9	1.6	1.3	1.1	1.3		1.3	-

Tabelle 19: Aktivität der Calcium-abhängigen ATPase in Abhängigkeit von der Zeit von unbehandelten Kontrollen und akut urämischen Tieren (Aktivität in $\mu Mol \times min^{-1} \times mg\ Protein^{-1}$)

	Phosphorylierung von Vesikelprotein	
	Kontrollvesikel	akut urämische Vesikel
Calcium $1.3\ \mu Mol \times ml^{-1}$	0.896	1.063
Hydroxylamin $100\ mMol \times ml^{-1}$	0.204	0.243

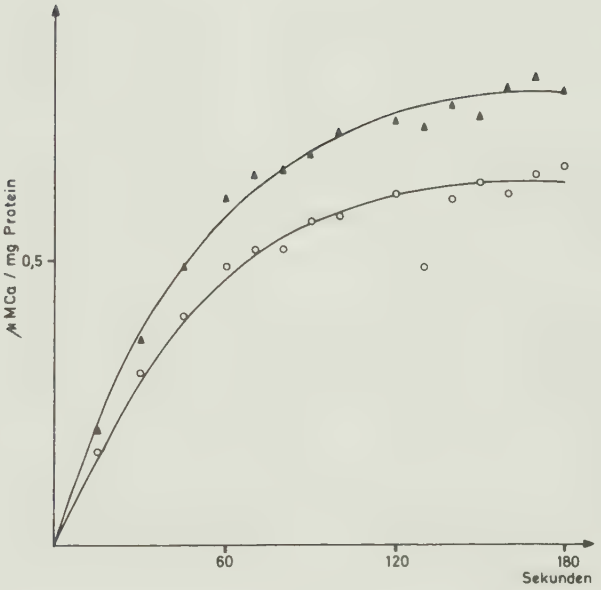
Tabelle 20: Die Phosphorylierung von Vesikelprotein bei Zugabe von Calcium und Hydroxylamin.

3.20 Tabelle 20 zeigt die Phosphorylierung von Protein von der Vesikelpräparation aus der Skelettmuskulatur von Kontrolltieren und von akut urämischen Tieren.

Nach Zugabe von Calcium wird vom Protein der Kontrollvesikel 1.063 Mol ^{32}P / 10^5 g ATPase inkorporiert, bei den akut urämischen Vesikeln nur 0.896 Mol ^{32}P / 10^5 g ATPase. In Gegenwart von 100 mMol Hydroxylamin werden in beiden Präparationen nur noch ungefähr 20 % der durch Calcium-stimulierten Aufnahmerate inkorporiert.

3.21 Die Graphik zeigt die Speicherung von $^{45}Ca^{2+}$ in den Vesikeln von Kontrolltieren und von akut urämischen Tieren.

Ein Plateau der Calciumspeicherung wird bei den Kontrolltieren bei einer Speicherung von 0.8 µMol x mg^{-1} erreicht, bei den akut urämischen Tieren beträgt das Plateau ungefähr 0.6 µMol x mg^{-1}.
Nach einer Zeit von 100 Sekunden liegt die Speicherungszunahme bei den Kontrolltieren unter 0.05 µMol/mg ^{45} Calcium.
Diese Speicherungszunahme wird bei den akut urämischen Tieren bereits nach 60 Sekunden unterschritten.
Die Gesamtspeicherung beträgt bei den Kontrolltieren 10.7 µMol Ca^{2+}, bei den akut urämischen Tieren 9.4 µMol Ca^{2+} bei insgesamt zugesetzten 13 µMol ^{45} Calcium.



Zeichnung 1: Die Graphik zeigt die Calciumspeicherung der Vesikel von Kontrolltieren und akut urämischen Tieren.
Prot. konz. 0.8 - 0.9 mg/ml übrige Angaben s. Versuchsbeschreibung 2.3.10

4. DISKUSSION

Die Isolierung von Vesikeln des sarkoplasmatischen Retikulums aus Skelettmuskulatur unbehandelter Ratten führt zu einer Proteinausbeute von 2 %, die Glykogen-Konzentration in der Vesikelfraktion liegt unter 1 µg/mg Protein, Glykogensynthetase wird mit einer spezifischen Aktivität von 7 nMol x min^{-1} x mg^{-1} isoliert, die Ausbeute der Calcium-ATPase liegt bei 20 %. Doppelt so hohe Calcium-ATPase-Konzentrationen bei einer Protein-Konzentration von 16.1 mg/ml und einer Glykogenausbeute von 2,7 % fanden wir im Kaninchenmuskel (16,17). Unter den Bedingungen einer akuten Urämie fällt die Ausbeute der Calcium-ATPase von 20 auf 5,3 %, während die spezifische Aktivität des Enzyms von 0.51 auf 0.79 µMol x min^{-1} x mg^{-1} ansteigt (vergl. Tabelle 2). Nach Untersuchungen von HÖRL und HEILMEYER (17) kommt es parallel mit Desentisierung der Calciumtransport-ATPase zu einem Aktivitätsanstieg. Diese Desensitisierung bei akuter Urämie könnte über eine partielle proteolytische Degradierung erfolgen, da die akute Urämie mit einer erhöhten proteolytischen Aktivität vorwiegend in der Skelettmuskulatur einhergeht (36). Phosphorylase-Kinase wird ebenfalls über eine proteolytische Degradierung aktiviert (37).

Oxalat führt in einer Konzentration von 4 mMol zu einer etwa 2,5fachen Stimulierung der Calciumtransport-ATPase, diese Stimulierung läßt sich auch unter den Bedingungen einer akuten Urämie nachweisen. Nach MACKINOSE und HASSELBACH (15) erfolgt die Oxalat-induzierte Stimulierung der Calciumtransport-ATPase über eine Calciumoxalatpräzipitation im Inneren der Vesikel mit konsekutiver Erniedrigung der intravesikulären Calciumionenkonzentration. Dieser Abfall der intravesikulären Calciumionenkonzentration führt zu einer maximalen Stimulierung der Calciumtransportpumpe. Dagegen machen die Untersuchungen von HÖRL (16) eine Aktivierung der Calcium-ATPase durch eine Oxalat-vermittelte Inhibierung der membrangebundenen Proteinphosphatase denkbar. In gleicher Weise wie 16 mMol Oxalat stimuliert 20 mMol Natriumfluorid die Calciumtransport-ATPase (vergl. Tabelle 10 u. 11). Fluorid ist eine der am längsten bekannten Phosphataseinhibitoren. Möglicherweise beeinflussen Calcium und Fluorid indirekt über eine Proteinphophatasehemmung die Calcium-ATPase-Aktivität. Synergistisch könnte die Aktivität der Calciumtransport-ATPase durch Präzipitation von Calcium-Fluorid ebenso wie durch Calcium-Oxalat im Inneren der Vesikel beeinflußt sein. Da das Löslichkeitsprodukt für Calcium-Fluorid mit 4×10^{-11} Mol um 2 Zehnerpotenzen niedriger liegt als für Calcium-Oxalat (2×10^{-9} Mol), sollte man erwarten, daß Fluorid die Calciumtransport-ATPase auch bei einer um 2 Zehnerpotenzen niedrigeren Konzentration aktiviert als Oxalat.

ATP-Konzentrationen zwischen 2.5 und 5 mMol im Inkubationsmedium lassen die Aktivität der Calcium-ATPase sowohl bei Kontrollen als auch unter den Bedingungen einer akuten Urämie unbeeinflußt. Dagegen führen niedrigere Konzentrationen (z.B. 0.5 mMol/ml) zwar unter Kontrollbedingungen zu einer Stimulierung der Oxalat-aktivierten ATPase, nicht jedoch unter den Bedingungen einer akuten Urämie. Offensichtlich führt die höhere ATPase-Aktivität unter den Bedingungen einer akuten Urämie zu einer vorzeitigen ATP-Erschöpfung bei zu niedriger ATP-Konzentration im Inkubationsmedium (vergl. Tabelle 12 u. 13).

Für die Bestimmung der spezifischen Aktivität der Calcium-ATPase hat sich eine Proteinkonzentration von 0.05 - 0.15 mg/ml als optimal erwiesen. Sowohl unter den Bedingungen einer akuten Urämie als auch unter Kontrollbedingungen liegen die spezifischen Aktivitäten der Calciumtransport-ATPase in Vesikeln des sarkoplasmatischen Retikulums bei Proteinkonzentrationen zwischen 0.05 und 0.2 mg/ml deutlich am höchsten mit rascher Inaktivierung des Enzyms mit Anstieg der Proteinkonzentration auf 1 mg/ml im Inkubationsansatz (vergl. Tabelle 14 u. 15).

Hydroxylamin hemmt die Aktivität von Phosphorylase-Kinase. Parallel mit dieser Inhibierung wird mit Anstieg der Hydroxylaminkonzentration im Inkubationsansatz auch die Aktivität der Calciumtransport-ATPase gehemmt.

Diese Korrelation zeigt, daß die Calciumtransport-ATPase des sarkoplasmatischen Retikulums aus Kaninchenmuskulatur durch die calciumabhängige Proteinkinase reguliert wird unter der Voraussetzung, das Hydroxylamin nur über eine Kinase-Hemmung auf die Calcium-ATPase wirkt. Nach Entfernung von Hydroxylamin (durch Dialyse) kommt es zu einer Reaktivierung der Calcium-ATPase (16). Eine Reaktivierung und Rephosphorylierung der Calciumtransport-ATPase nach Entfernung von Hydroxylamin konnten auch INESI et al. (38) demonstrieren. Hydroxamatderivate der ATPase können damit im nativen Enzym nicht entstanden sein, wie von POST und KUME (39) vermutet wurde, denn dadurch würde die ATPase-Aktivität irreversibel gehemmt werden. In Vesikeln des sarkoplasmatischen Retikulums aus Rattenmuskulatur führt Hydroxylamin nur unter den Bedingungen einer akuten Urämie zu der typischen Inaktivierung der Calciumtransport-ATPase, ein Effekt, der bei unbehandelten Kontrollen ausbleibt (vergl. Tabelle 16 u. 17).

In Abhängigkeit vom Alter der Vesikelfraktionen kommt es zu einem kontinuierlichen Anstieg der spezifischen Aktivität der Calciumtransport-ATPase bis zu einem Maximum nach 15 Tagen (17).
In unseren Versuchen kommt es unter Kontrollbedingungen zu einer Abnahme der Calcium-stimulierten ATPase auf 0.43 bzw. 0.05 µMol x min^{-1} x mg-$Protein^{-1}$ am 21. bzw. 24. Tag, während unter den Bedingungen einer akuten Urämie die spezifische Aktivität der Calciumtransport-ATPase am 24. Tag noch 0.82 µMol x min^{-1} x mg^{-1} beträgt (vergl. Tabelle 18).

Abbildung 1 zeigt, daß unter den Bedingungen einer akuten Urämie die Calciumaufnahme in die Vesikel des sarkoplasmatischen Retikulums unter der Aufnahmerate und der Speicherkapazität unbehandelter Kontrollen liegt. Nach MATTHEWS et al. (26) ist die verminderte Speicherkapazität in Vesikel des sarkoplasmatischen Retikulums bei akut urämischen Kaninchen vor allem durch einen erhöhten Calciumefflux aus den Vesikeln bedingt.

Durch die erhöhte spezifische Aktivität der Calcium-ATPase und der verminderten Calciumaufnahme unter den Bedingungen der akuten Urämie errechnet sich aus unseren Versuchen etwa eine Calciumaufnahme von 1 Mol/1 Mol gespaltenem ATP, während normalerweise 2 Mol Calcium/1 Mol gespaltenem ATP verbraucht werden.

5. Z U S A M M E N F A S S U N G

Aus der Skelettmuskulatur binephrektomierter und unbehandelter Ratten wurde sarkoplasmatisches Retikulum isoliert. Folgende Ergebnisse wurden erarbeitet:

1. In den Vesikeln akut urämischer Ratten betrug die spezifische Aktivität der Ca^{2+} - ATPase 0.79 µMol x min^{-1} x mg^{-1} bei einer Enzymausbeute von 20 %, die spezifische Aktivität lag für unbehandelte Kontrollen bei 0.51 µMol x min^{-1} x mg^{-1} (Ausbeute 5 %).

2. Zusammen mit den Vesikeln des sarkoplasmatischen Retikulums wurden Glykogen und die Schlüsselenzyme des Glykogenstoffwechsels (Phosphorylase - Kinase, Phosphorylase, Phosphorylase - Phosphatase und Glykogen - Synthetase) isoliert. Die spezifische Aktivität dieser Enzyme unterscheidet sich nicht sicher bei akut urämischen und unbehandelten Ratten.

3. Während der Vesikelisolierung kommt es zu einer Oxalatstimulierung der Ca^{2+} - ATPase bei unbehandelten Kontrollen von 1.3 (Rohextrakt) auf das 2.5-fache (Vesikelfraktion). Dieses Verhältnis bleibt für akut urämische Tiere unverändert bei 2.2. Oxalat stimuliert die Ca^{2+} - ATPase unbehandelter Kontrollen in einer Konzentration von 4 - 20 mMol 2.2 - bis 3.2 - fach, bei akuter Urämie von 2.0 - 2.2 - fach.

Die höchste Fluoridstimulation der Ca^{2} - ATPase erfolgt bei den Kontrollen bei 10 mMol NaF (2.6 - fach), bei akuter Urämie blieb die Fluoridstimulation zwischen 5 und 50 mMol NaF mit 1.9 unverändert (50 mMol NaF führen bei unbehandelten Kontrollen zu keiner ATPase Aktivierung).

4. Die spezifische Aktivität der Phosphorylase - Kinase beträgt in der Vesikelfraktion gegenüber der Aktivität im Rohextrakt in beiden Präparationen unter 1 %. In der Vesikelfraktion beträgt die Aktivität der Binephrektomierten bei pH 6.8 36 %, bzw. bei pH 8.6 44 % der Aktivität der Kontrolltiere.

5. Die Gesamtaktivität der Phosphorylase - Phosphatase liegt in der Vesikelfraktion in beiden Präparationen unter 1 % des Ausgangswertes im Rohextrakt. Die spezifische Aktivität beträgt in der Vesikelfraktion bei den akut urämischen Tieren mit 3.2 11 %, bei den Kontrollen mit 4.9 nMol x min^{-1} x mg $Protein^{-1}$ 20 % des Ausgangswertes im Rohextrakt.

6. Die Ca^{2+} - ATPase wird bei unbehandelten Kontrolltieren bereits bei einer ATP-Konzentration von 0.5 mMol aktiviert (spezifische Aktivität 0.24 µMol x min^{-1} x min^{-1}), während eine vergleichbare Aktivität (0.27 µMol x min^{-1} x mg^{-1}) bei den binephrektomierten Tieren erst in Gegenwart von 1 mMol ATP zu messen ist.

7. In Gegenwart von 0.05 mg/ml Vesikelprotein läßt sich bei den Kontrollen die Ca^{2+} - ATPase durch 4 mMol Oxalat 3.7 - fach, nach Binephrektomie um das 1.3 - fache stimulieren. Bei 1.0 mg Vesikelprotein liegen die Vergleichswerte 1.5 - bzw. 2.0 - fach höher.

8. Hydroxylamin (0.1 und 0.2 M) inhibiert nach Binephrektomie die Ca^{2+} - ATPase, ein Effekt, der bei den Kontrollen ausbleibt.

9. Nach Binephrektomie steigt die spezifische Aktivität der Ca^{2+} - ATPase innerhalb von 24 Tagen mit dem Alter der Vesikel von 0.41 auf 0.82 µMol x min^{-1} x mg^{-1}, während die spezifische Aktivität der Kontrollen nach 24 Tagen unmeßbar niedrig ist.

10. Die Ca^{2+} - ATPase urämischer und unbehandelter Ratten läßt sich mit ATP - γ - ^{32}P in Gegenwart von Calcium bzw. Hydroxylamin in vergleichbarer Größenordnung phosphorylieren und desphosphorylieren.

11. Akut urämische Vesikel nehmen ^{45}Ca mit geringerer Geschwindigkeit und geringerer Speicherkapazität auf.

6. L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

1. EBASHI, S., M.ENDO:
Calcium ion and muscle contraction.
Progress in biophysics and molecular biology, edited by J.A.V. Butler and D. Noble, New York: Pergamon Press 18: 123, 1968

2. WEBER, A., J.M. MURRAY:
Molecular control mechanisms in muscle contraction. Physiol. Rev. 53 (3): 612, 1973

3. EBASHI, S., A. KODAMA:
A new factor promoting aggregation of tropomyosin. J. Biochem. (Tokyo) 58: 107, 1965

4. EBASHI, S., I. OHTSUKI, K. MTHASHI:
Regulatory proteins of muscle with special reference to troponin.
Cold Spring Harbor Symp., Quant. Biol. 37: 215, 1973

5. GREASER, M.L., J. GERGELY:
Purification and properties of the components from troponin.
J. Biol. Chem. 248 (6): 2125, 1973

6. HARTSHORNE, D.J., H.Y. PYUN:
Calcium binding by the troponin complex, and the purification and properties of troponin A.
Biochem. Biophys. Acta 229 (3): 698, 1971

7. POTTER, J.D., J. GERGELY:
Troponin, tropomyosin and actin interactions in the Ca^{2+} regulation of muscle contraction.
Biochemistry 13 (13): 2697, 1974

8. PERRY, S.V., H.A. COLE, J.F. HEAD, F.J. WILSON:
Localization an mode of actin of inhibitory protein component of troponin complex.
Cold Spring Harbor Symp., Quant. Biol. 37: 251, 1973

9. WILKINSON, J.M., S.V. PERRY, H.A. COLE, I.P. TRAYER:
The regulatory proteins of the myofibril: Separation and biological activity of the components of inhibitory-factor preparations.
Biochem. J. 127 (1): 215, 1972

10. HITCHCOCK, S.E., H.E. HUXLEY, A.G. SZENTGYO:
Calcium sensitive binding of troponin to actin-tropomyosin-2-site model für troponin action. J. Mol. Biol. 80 (4): 825, 1973

11. HELMREICH, E. C.F. CORY:
Regulation of glycogenolysis in muscle.
In: Advances in Enzyme Regulation, edited by G. Weber. New York: Pergamon Press 3: 91, 1965

12. HEILMEYER, L.M.G., jr., F. MEYER, R.H. HASCHKE, E.H. FISCHER:
Control of phosphorylase activity in a muscle glycogen particle. II. Activation by calcium.
J. Biol. Chem. 245: 6649, 1970

13. WEBER, K., M. OSBORN:
The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamid gel electro phoresis.
J. Biol. Chem. 244 (16): 4406, 1969

14. HASSELBACH, W.
Release and uptake of calcium by the sarcoplasmic reticulum.
In: Molecular Basis of Motility, edited by L.M.G. Heilmyer jr., J.C. Rüegg, Th. Wieland. Springer Verlag Berlin, Heidelberg New York 26: 81, 1976

15. MAKINOSE, M., W. HASSELBACH:
Der Einfluß von Oxalat auf den Calcium-Transport isolierter Vesikel des sarkoplasmatischen Retikulum.
Biochem. Z. 343 (4): 360, 1965

16. HÖRL, W.H., H.P. JENNISSEN, L.M.G. jr. HEILMEYER:
Evidence for the participation of a Ca^{2+}-dependent protein kinase and a protein phosphatase in the regulation of the Ca^{2+}-transport ATPase of the sarcoplasmic reticulum.
I. Effect of inhibitors of the Ca^{2+}-dependent protein kinase and protein phosphatase.
Biochemistry 17: 759, 1978

17. HÖRL, W.H., L.M.G. jr. HEILMEYER:
Evidence for the participation of a Ca^{2+}-dependent protein kinase and a protein phosphatase in the regulation of the Ca^{2+}-transport ATPase of the sarcoplasmic reticulum. II. Effect of phosphorylase kinase and phosphorylase phosphatase.
Biochemistry 17: 766, 1978

18. HÖRL, W.H., J. STEPINSKI, A. HEIDLAND:
Carbohydrate metabolism and uremia-mechanisms for glycogenolysis and gluconeogenesis.
Klin. Wochenschr. 58: 1051, 1980

19. HÖRL, W.H., A. HEIDLAND:
Glycogen metabilism in muscle in uremia.
Am. J. Clin. Nutr. 33: 1461, 1980

20. BUNDSCHU, H.D., H.E. REICHENMILLER, R. SUCHEN-WIRTH:
Das morphologische Bild der urämischen Myopathie.
In: Aktuelle Probleme der Dialyseverfahren und der Niereninsuffizienz. Hrsg.: Dittrich, E.v., F. Skrabal, W.D. Stühliger, Verlag Carl Bindernagel, Friedberg, S. 460, 1975

21. DE FRONZO, R.A., D.T. JORDAN, J.W. ROWE, R. ANDRES:
Glucose intolerance in uremia. Quantification of pancreatic beta cells sensitivity to glucose and tissuse sensitivity to insulin.
J. Clin. Invest. 62: 425, 1978

22. SCHMIDT, G., L. FRICKE, K. HEMPEL, A. HEIDLAND:
Erhöhter cAMP-Gehalt des quergestreiften Muskels bei chronischer Niereninsuffizienz.
Dtsch. Med. Wschr. 100: 2397, 1975

23. HÖRL, W.H., J. SPERLING, A. HEIDLAND:
Endhanced glycogen turnover in skeletal muscle of uremic rats - cause of uncontrolled actomyosin ATPase.
Am. J. Clin. Nutr. 31: 1861, 1978

24. BROSTROM, C.O., F.L. HUNKELER, E.G. KREBS:
The regulation of skeletal muscle phosphorylase kinase by Ca^{2+}.
J. Biol. Chem. 246: 1961, 1971

25. KILLIMANN, M., L.M.G. jr. HEILMEYER:
The effect of Mg^{2+} on the Ca^{2+}-binding properties of non-activated phosphorylase kinase.
Eur. J. Biochem. 73: 191, 1977

26. MATTHEWS, C., K.W. HEIMBERG, E. RITZ, B. AGOSTINI, W. HASSELBACH:
Effect of 1.25 dihydroxycholecalciferol on impaired calcium transport by the sarcoplasmic reticulum in experimental uremia.
Kidney Int. 11: 227, 1977

27. DE MEIS, L., W. HASSELBACH:
Acetyl phosphate as substrate for Ca^{2+} uptake in skeletal muscle microsomes.
J. Biol. Chem. 246: 4759, 1971

28. LOWRY, O.H., N.J. ROSEBROUGH, A.L. FARR, R.J. RANDALL:
Protein measurements with the folin phenol reagent.
J. Biol. Chem. 193: 265, 1951

29. MONTGOMERY, R.:
Determination of glycogen.
Arch. Biochem. Biophys. 67: 378, 1957

30. FISKE, C.H., I. SUBBAROW:
The colorometric determination of phosphorus.
J. Biol. Chem. 66: 375, 1925

31. THOMAS, J.A., K.K. SCHLENDER, J. LARNER:
A rapid filter paper assay for UDP glucose-glycogen glucosyltransferase, including an improved biosynthesis of UDP^{14}-C-glucose.
Anal. Biochem. 25: 486, 1968

32. MAKINOSE, M., W. HASSELBACH:
Phosphorylation of membranal protein of sarcoplasmic vesicles during active calcium transport.
Eur. J. Biochem. 10: 74, 1969

33. JENNISSEN, H.P., L.M.G. jr. HEILMEYER:
An automated assay for phosphorylase kinase.
Anal. Biochem. 57: 118, 1974

34. HASCHKE, R.H., L.M.G. jr. HEILMEYER, F. MEYER, E.H. FISCHER:
Control of phosphorylase activity in a muscle glycogen particle. III. Regulation of phosphorylase phosphatase.
J. Biol. Chem. 245: 6657, 1970

35. JENNISSEN, H.P., HEILMEYER, L.M.G.:
General aspects of hydrophophobic chromatography-adsorption and elution characteristics of some skeletal-muscle enzymes.
Biochemistry 14 (4): 754, 1975

36. HÖRL, W.H., A. HEIDLAND:
Enhanced proteolytic activity - cause of protein catabolism in acute renal failure.
Am. J. Clin. Nutr. 33: 1423, 1980

37. COHEN, P.:
Subunit structure of rabbit-skeletal-muscle phosphorylase kinase and molecular basis of its activation reactions.
Eur. J. Biochem. 34 (1): 1-14, 1973

38. INESI, G., KURZMACK, M., VERJOVSK, S.:
ATPase phosphorylation and calcium ion translocation in transient state of sarcoplasmic reticulum activity.
Ann. NY Acad. 307: 224, 1978

39. POST, R.L., KUME, S.:
Evidence for an aspartyl phosphate residue of active-site of sodium and potassium-ion transport adenosine-triphosphatase.
J. Biol. Chem. 248 (20): 6993, 1973

Herrn Prof. Dr. med. A. Heidland danke ich herzlich für die Überlassung des Themas und die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes im Bereich der Nephrologischen Abteilung der Medizinischen Universitätsklinik.

Herrn Prof. Dr. med. K. Kochsiek danke ich für die freundliche Übernahme des Korreferates.

Herrn Dr. rer. nat. Dr. med. W. Hörl danke ich besonders herzlich für seine Anleitungen, seine unermüdliche Hilfsbereitschaft und seinen kritischen Diskussionsbeiträgen.

Weiterhin möchte ich mich bei Fräulein Elvira Scheuermann für Ihre Assistenz bei den Tierversuchen und Routinemethoden bedanken.

Lebenslauf

Name:	Klaus Ludwig Kröckel
Geboren am:	31.10.1948 in Bad Neustadt a.d.Saale (Landkreis Rhön-Grabfeld)
Beruf:	Assistenzarzt
Familienstand:	Verheiratet
Wohnung:	8700 Würzburg, Langes Gräthlein 30
Schulen:	1955-1959 Volksschule Brendlorenzen 1959-1965 Realgymnasium Bad Neustadt/S. 1965-1969 Berufsschule Bad Neustadt/S. Lehre als Elektromechaniker bei der Fa. Siemens-AG in Bad Neustadt/S.; Abschluß mit der Facharbeiterprüfung 1969-1970 Mittlere Reife an der Berufsaufbauschule in Bad Neustadt/S. 1971-1973 Allgemeine Hochschulreife am Bayernkolleg Schweinfurt
Studium:	1974-1980 Medizinstudium an der Julius-Maximilians-Universität in Würzburg
Auslandsfamulatur:	Aug.-Sept. 78 in Dumaguete, Philippinen im Siliman University Medical Center
Praktisches Jahr:	April-Juli 1979 Neurologie an der Neurolog. Universitätsklinik Würzburg

	Aug.-Nov. 1979 Chirurgie an der Chirurg. Universitätsklinik Würzburg
	Dez. 1979-März 1980 Innere Medizin Medizinische Universitätsklinik Würzburg
Medizinisches Staatsexamen:	29. Mai 1980
Approbation als Arzt:	03. Juni 1980
Assistentenzeit:	01.08.1980-31.03.1981 am Kreiskrankenhaus in Kitzingen als chirurgischer Assistenzarzt
Tätigkeit:	Assistent in der Chirurgie des Leopoldina Krankenhauses Schweinfurt.

Klaus Klöckel

Dissertationsdruck
Schmitt & Meyer

Würzburg Ludwigkai 28a Tel. 7 23 80

Dissertationsdruck
Schmitt & Meyer

Würzburg Ludwigkai 28a Tel. 7 23 80